Lane Medical Library

Aus dem chemischen Laboratorium (Priv.Doz. Dr. W. Schuler)
der Mediz. Klinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. L. R. Müller)

Zur Harnsäuresynthese im Tauben-Organismus.

Die Rolle der Leber bei der Harnsäuresynthese.

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Bayerischen

Friedrich-Alexanders-Universität

Erlangen

vorgelegt von

Renzo Ziebarth

aus Florenz.

Tag der mündlichen Prüfung: 13. I. 1935.

Kallmünz

Dissertationsdruckerei Michael Laßleben

1935

Referent: Herr Privatdozent Dr. med. Werner Schule
Dekan: Herr Univ.-Professor Dr. med. Friedrich Jami

Einteilung.

I. Allgemeiner Teil. 5
1. Der Ort der Harnsäuresynthese.
2. Der Vorgang in der Niere.

II. Besonderer Teil. 8
Der Vorgang in der Leber.
1. Verwendungsmöglichkeit von Lebertrockenpulver.
2. Die Bildung der Harnsäurevorstufe ist ein Fermentprozeß; denn sie ist abhängig
a) von der Zeit,
b) von der Temperatur,
c) von einem ph-Optimum.
3. Die Wirkung von Zusätzen auf den Reaktionsverlauf.
4. Die Frage des Gasbedarfes für den Vorgang in der Leber.
5. Verwendungsmöglichkeit von Trockenpulver aus Gänseleber.

III. Zusammenfassung. 14

IV. Versuchsteil. 15

V. Literatur. 21

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153708_0052

Allgemeiner Teil.

Die chemische Erforschung des Stoffwechsels hat zwar den Abbau der dem Organismus zugeführten Nährstoffe bereits weitgehend geklärt. Über den Aufbau körpereigener Stoffe jedoch konnte bis jetzt trotz eifrigsten Forschens nur wenig Positives zu Tage gefördert werden. Dies gilt sowohl für unsere Kenntnisse über Synthesen beim Kohlehydrat- und Eiweißstoffwechsel als auch besonders für den Aufbau von Zellkernsubstanzen. Wir wissen, daß Harnsäure eines der charakteristischen Endprodukte des Zellkernzerfalls darstellt, wir können die Spaltung der Nukleoproteide über Nukleotide und Nukleoside bis zum Gerüst der Harnsäure verfolgen, doch der Aufbau des Purinskeletts, des Grundstockes für die Synthese der Zellkernsubstanzen, ist uns noch unbekannt. Bekannt jedoch ist, daß Vögel das Purinskelett zum Zwecke der Stickstoffausscheidung in Form der Harnsäure synthetisieren.

Diese Purinskelettsynthese bei Vögeln ist der experimentellen Untersuchung leichter zugänglich und bietet Aussicht, der Beantwortung der Purinsynthese im Säugetierorganismus den Weg zu eröffnen. Die bisherigen Kenntnisse über die Harnsäuresynthese im Vogelorganismus sind dürftig. O. Minkowski (1) zeigte, daß die Leber der Vögel für die Harnsäurebildung notwendig sei. H. Wiener (2) glaubte aus seinen Versuchen schließen zu dürfen, daß Harnsäure in der Leber der Vögel aus Harnstoff und einer Dreikohlenstoffverbindung entstehe. Wegen der Bedeutung des Problems für die Erkenntnis des Nukleinstoffwechsels haben W. Schuler und W. Reindel (3) mit moderner Versuchsanordnung die Frage nach der Harnsäuresynthese im Vogelorganismus von neuem aufgegriffen.

Diese Autoren haben Schnitte lebender Taubenleber- und Niere getrennt in physiologischer Salzlösung in Sauerstoffatmosphäre geschüttelt und nur in letzterem Falle eine mit der Zeit zunehmende geringe Vermehrung von Harnsäure gefunden. Als sie beide Organe zusammen unter gleichen Bedingungen schüttelten, erhielten sie die vierfache Menge der Summe der Harnsäure bei getrennt geschüttelten Organen. Sie stellten dadurch fest, daß bei der Harnsäurebildung in der Taube sowohl Leber als auch Niere eine wesentliche Rolle spielen. Um ferner zu beweisen, daß die Harnsäure synthetisch und nicht aus Purinen durch Purinoxydasen gebildet wurde, setzten sie verschiedene Purine wie Guanin, Hypoxanthin und Xanthin ihren

Versuchen zu und fanden, daß überlebende Pankreas- und Nierenschnitte (auch Leberschnitte, aber nicht so zuverlässig) diese Purine quantitativ zu Harnsäure oxydieren. Leber, die mit Niere starke Harnsäurevermehrung gab, ergab mit Pankreas geschüttelt kaum mehr Harnsäure, als es der Summe der Einzelversuche entspricht. Aus weiteren Experimenten folgerten sie, daß der Ort der eigentlichen Harnsäurebildung die Niere ist und daß die Leber nur einen wasserlöslichen Stoff, Vorstufe genannt, enthält, aus dem die Niere Harnsäure synthetisiert. Es teilte sich somit die weitere Bearbeitung in zwei Richtungen: es mußte die Beziehung der Leber zur Vorstufe und die Rolle der Niere für die eigentliche Harnsäurebildung geklärt werden.

Die Bearbeitung der letztgenannten Fragestellung wurde von W. Nürmberger (4) ausgeführt, auf dessen Ergebnisse zum Verständnis des später von mir behandelten Vorganges in der Leber näher eingegangen werden muß.

W. Nürmberger benötigte vorerst eine größere Menge von Leberextrakt, der die Vorstufe unter konstanten Bedingungen enthält, nachdem sich im Laufe der Zeit zeigte, daß die Vorstufe in den einzelnen Taubenlebern in verschiedener Menge enthalten war. Es fand sich schließlich, daß ein brauchbarer Extrakt dadurch zu erhalten war, daß man Frischleberschnitte in Phosphatpuffer ph 8,3 bei Taubenkörpertemperatur von 41 Grad vier Stunden lang extrahierte und nach Aufkochen filtrierte. Dabei spielte das Mengenverhältnis Leber-Extraktionsmittel keine nennenswerte Rolle. Wesentlich wurden die Versuche dadurch erleichtert, daß W. Nürmberger zeigen konnte, daß der Extrakt bei Aufbewahrung unter Toluol im Eisschrank seinen Vorstufengehalt längere Zeit unverändert behält.

Zu einem derartigen Leberextrakt wurden nach Verdünnung in physiologischer Lösung überlebende Nierenschnitte gegeben, bei einer Temperatur von 41 Grad im Thermostaten geschüttelt und die gebildete Harnsäure bestimmt. Um den zeitlichen Ablauf dieser Reaktion zu ermitteln, wurde in halbstündigen Zwischenräumen der Gehalt an Harnsäure festgestellt. Die Ergebnisse zeigten eine anfangs schnelle, nach zwei bis drei Stunden an Geschwindigkeit abnehmende und nach sechs Stunden fast völlig beendete Harnsäurebildung. Der geringe organeigene Harnsäuregehalt wurde natürlich entsprechend berücksichtigt. Ein Mehrverbrauch an Sauerstoff wesentlich über den Bedarf der Gewebsatmung konnte nicht gefunden werden. Kohlensäurezuleitung ist nicht erforderlich, zumal sie ja bei der Gewebsatmung entsteht. Die Frage, ob die Harnsäuresynthese an lebendes Gewebe gebunden ist, erhielt schließlich noch dadurch ihre Bejahung, daß die Reaktion mit Nierenextrakt an Stelle

von lebendem Nierengewebe oder unter Aufhebung der Atmung mittels Toluol ein negatives Resultat zeitigte.

Als nächst wichtige Aufgabe kam die Ermittelung des ph-Optimums in Betracht, unter dem die Reaktion sich abspielt. Erschwerend wirkte bei diesem Problem die verschiedene Wirksamkeit der einzelnen Taubennieren, sodaß Vergleichswerte nur mit Nieren eines Tieres ermittelt werden konnten, die wieder durch ihre Kleinheit die Zahl der möglichen Versuche einschränkten. Bei den Versuchen wurde der Leberextrakt, der bei seiner Bereitung saure Reaktion annahm, erst dem für den Nierenversuch nötigen ph angepaßt. Dann kamen die Nierenschnitte in verschiedener ph-Lösung. Am Schlusse jedes Nierenversuches wurde die Wasserstoffionenkonzentration auf elektrometrischem Wege bestimmt. Als Resultat ergab sich das Optimum der Harnsäuresynthese in der Niere bei einem ph von 7,1.

Besonderer Teil.

Nachdem so durch W. Nürmberger die Faktoren des Reaktionsverlaufs in der Niere bekannt wurden, konnte ich, mir die bei den vorherigen Versuchen erworbenen Erfahrungen zunutze machend, den Teil der Arbeit übernehmen, der Einzelheiten über die Bedeutung der Leber für die Harnsäurevorstufe bringen sollte. Die Versuche hierüber wurden dementsprechend unter Konstanthaltung der optimalen Nierenbedingungen ausgeführt.

Da die Leber einer einzigen Taube nur zu wenigen Versuchen reichte und bei Benützung von Lebern verschiedener Tauben auch immer wieder mit anderen Bedingungen zu rechnen war, galt es in erster Linie die Frage zu lösen, ob sich Leber nicht in Form von Trockenpulver zur Verwendung eigne. Wir teilten die Leber einer Taube in zwei Hälften, von denen die eine wie gewöhnlich in dünnen Schnitten in Phosphatpufferlösung extrahiert wurde. Der Rest der Leber wurde nach Willstätter mittels Aceton und Aether in feines Pulver verwandelt, das wir in entsprechender Menge Pufferlösung aufgeschwemmt, ebenfalls im Thermostaten schüttelten. Beide Extrakte versetzten wir hierauf bei ph 7,1 mit Niere. Glücklicherweise erzielten wir bei Verwendung von Acetonleber mit Niere einen synthetischen Harnsäurewert, der dem mit Frischleber erreichten nur um ein Geringes nachstand. Da demnach auch mit Lebertrockenpulver Harnsäurevorstufe in guter Ausbeute zu gewinnen war, gestalteten sich die weiteren Untersuchungen um so leichter, als wir im Voraus aus mehreren Tauben eine genügende Menge Lebertrockenpulver herstellen konnten und wir somit konstant wirkendes Ausgangsmaterial an Leber zur Verfügung hatten (siehe Versuch 1). 1 g Trockenleber entspricht etwa 5 g Frischleber an Vorstufengehalt (siehe Versuch 2).

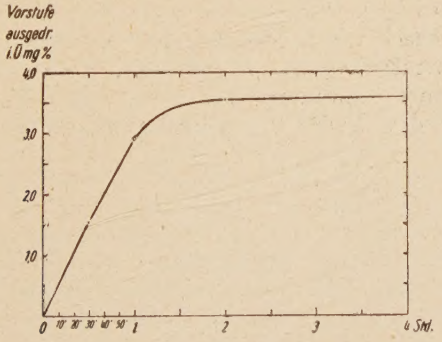
Für die Tatsache, daß nach Schütteln von Frischleberschnitten oder Lebertrockenpulver in Pufferlösung Vorstufe in dieser Lösung enthalten ist, die durch überlebende Nierenschnitte in Harnsäure übergeführt werden kann, waren zwei Erklärungsmöglichkeiten gegeben:

1. Die Vorstufe konnte in der Leber schon vorhanden sein und während des vierstündigen Schüttelns in physiologischer Lösung durch einfache Extraktion in Lösung gehen.

2. Es ist aber auch der Fall denkbar, daß Vorstufe während des Schüttelns von Leber in physiologischer Lösung neu gebildet wurde.

Die Entscheidung über diese prinzipiellen Fragen wurde zuerst durch Versuche getroffen, die den Harnsäurewert aus Vorstufe von ungekochten Leberschnitten bezw. ungekochtem Organpulver mit dem aus Vorstufe von gekochter Frisch- bezw. Pulverleber erzielten vergleichen ließ. Wir stellten daher einem Nierenversuch mit Frischleber einen solchen gegenüber, bei welchem die Leber sofort nach Exstirpation zerkleinert in einer bereits siedenden Pufferlösung für fünf Minuten aufgekocht wurde. Als Resultat stellte sich heraus, daß eine wesentliche Vermehrung von Harnsäure nur durch die Reaktion von Niere mit ungekochten Leberschnitten bezw. ungekochtem Trockenpulver zustande kam. (Versuch 2). Dies ließ vermuten, daß Vorstufe nicht nur aus der Leber extrahiert wird, sondern daß ungekochte Leber Vorstufe neu zu bilden vermag. Den Beweis dafür brachten uns schließlich folgende Versuche: Wurde Leber verschiedene Zeit lang mit Pufferlösung geschüttelt, aufgekocht, filtriert und die in der Lösung vorhandene Vorstufe mit Nierenschnitten in Harnsäure umgewandelt und als solche bestimmt (Vorstufebestimmung), so fand sich eine mit der Zeit zunehmende der Vorstufe entsprechende Menge an Harnsäure in der Lösung. Die die Vorstufe enthaltenden Leberlösungen wurden deshalb sofort nach dem Schütteln aufgekocht und filtriert um einer weiteren Bildung von Vorstufe, die evtl. noch während der Vorstufenbestimmung mit der Harnsäurebildung aus Vorstufe parallel laufen könnte, entgegen zu wirken. Die Menge an Vorstufe in der Pufferlösung nimmt, wie aus nebenstehender Kurve ersichtlich ist, in den ersten zwei Stunden rasch zu um darauf langsam abzuklingen und nach vier Stunden praktisch beendet zu sein (Versuch 3 und Figur 1).

Figur 1.



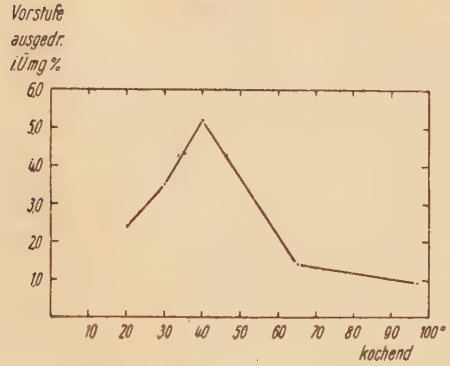
Bildung der Ü-Vorstufe in der Leber.

Aus diesem Grunde schüttelten wir bei der Bereitung der Vorstufenlösung aus Leberpulver nur noch zwei Stunden.

Rückblickend können wir somit sagen, daß in der Taubenleber nicht eine einfache Extraktion einer schon vorhandenen Harnsäurevorstufe erfolgt, sondern daß wir es mit einer Neubildung derselben zu tun haben, die nicht an lebendes Gewebe gebunden ist. Es ist klar, daß wir von nun an die vorher ungekochte, geschüttelte und filtrierte Leberflüssigkeit nicht mehr als Extrakt, sondern als Vorstufenlösung bezeichnen müssen, ganz gleich, ob es sich um Vorstufe handelt, die aus Frischleber oder aus Trockenleber gewonnen wurde.

Eine Neubildung von Vorstufe, die nicht an das Überleben von Gewebe gebunden ist, kann nur fermentativ bedingt sein. Dafür spricht auch die in Figur 1 ersichtliche Abhängigkeit der Bildung von der Zeit, wie sie uns bei Fermentreaktionen geläufig ist. Doch der Beweis für das Vorliegen einer Fermentreaktion ist nicht vollständig erbracht ohne den Nachweis, daß die Neubildung von Vorstufe ein ph-Optimum sowie ein ausgesprochenes Temperaturoptimum besitzt, das in der Nähe der Körpertemperatur des Tieres gelegen sein muß. Zum Nachweis eines Temperaturoptimums wurde die Gewinnung von Vorstufe bei 20°, 30°, 40°, 65° und 90° durchgeführt. Bei der Herstellung einer Vorstufenlösung von 90° wurde das Pulver im kochenden Wasserbade mit siedendem Phosphatpuffer übergossen und eine Viertelstunde weiter erhitzt. Wir suchten so durch eine möglichst rasche Applikation der Siedetemperatur zu vermeiden, daß durch allmähliches Erhitzen sämtliche Temperaturstufen von 20—90° durchlaufen werden und sich die Bildung der Vorstufe bei einer evtl. anderen günstigen Temperatur vollziehen könnte. Der quantitative Harnsäurenachweis in den bei den genannten Temperaturen dargestellten Vorstufenlösungen ergab nach Einwirkung von Niere ein ausgesprochenes Optimum bei 40°, eine Temperatur, die dem Organismus der Taube entspricht (Versuch 4 und Figur 2).

Figur 2.



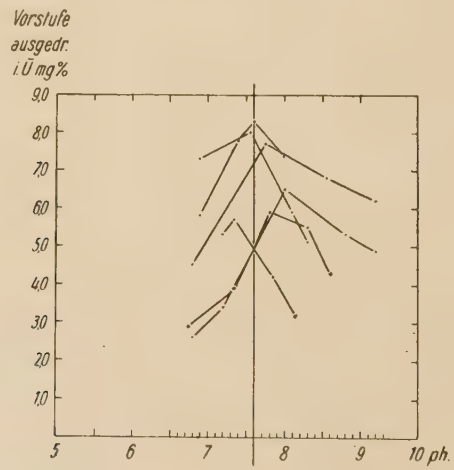
Temperaturoptimum der Bildung der U-Vorstufe in der Leber

Wenn sich die Vorstufenbildung in der Leber fermentativ abspielen soll, so muß der Reaktionsverlauf — wie schon erwähnt — eine weitere Bedingung erfüllen: Die Geschwindigkeit der Vorstufenbildung muß bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration ein Maximum aufweisen.

Zur Ermittlung dieser Forderung wurde Lebertrockenpulver anfänglich mit Phosphatpuffer von verschiedenem ph geschüttelt, die Lösung gekocht und anschließend filtriert. Bei späteren Versuchen kam ein Glykokoll-Natronlaugepuffer in Anwendung, der die einzelnen ph-Bereiche besser abgrenzen ließ. Da Glykokoll eine Aminosäure und mithin stickstoffhaltlich ist, galt es erst, den Einfluß desselben im Vergleich zu Phosphatpuffer sicherzustellen. Wie entsprechende Versuche zeigten (5), sind sich beide Puffer relativ in ihrer Wirkung auf Vorstufenbildung ebenbürtig. Die ph-Versuche konnten immer nur mit der Niere eines einzigen Tieres zu Ende geführt werden, da die Nieren verschiedener Tauben bezüglich ihrer Fähigkeit, eine konstante Menge Vorstufe in Harnsäure umzuwandeln, sich sehr ungleich verhielten, wie schon die Arbeiten über den Nierenvorgang ergeben haben. Andrerseits ließ die Kleinheit der Taubennieren nur eine geringe Anzahl Vergleichsversuche zu. Wir waren daher veranlaßt, zuerst den weiteren und später den engeren Bereich für das ph-Optimum aufzusuchen. Da zur Vorstufenbildung Lösungen mit ph-Werten von 7—10 eingesetzt wurden, mußte eine Störung der Umwandlung von Vorstufe in Harnsäure in der Niere, die bekanntlich bei ph 7,1 optimal verläuft, dadurch vermieden werden, daß wir die schwach alkalischen Vorstufenlösungen dem ph-Bereich der Niere anpaßten. Da-

zu wurde Kresolrot als Indikator benützt und gegen n/10 HCl titriert. Die Verwendung von Kresolrot war dadurch begründet, daß dieser Indikator, der die Alkaleszenz von ph 7,2—8,8 in roter Farbe anzeigt, durch Säuregabe bei der gleichen Wasserstoffionenkonzentration, die sich für den Vorgang in der Niere als vorteilhaft erwiesen hat, seinen Umschlagspunkt in gelb besitzt. Der Verbrauch an Salzsäure erfuhr natürlich beim Nierenversuch die gebührende Berücksichtigung, wie beim Versuchsteil ausgeführt wird. Befürchtungen, es könnte die Zugabe von Indikatoren wie Phenolphthalein, Kresolrot usw. der Harnsäurebildung hinderlich sein, wurden durch sinngemäße Versuche bald entkräftet. Der größeren Genauigkeit halber wurde bei den ph-Versuchen das Leberpulver auf der analytischen Wage gewogen, in dem entsprechenden Puffer aufgeschlemmt und zwei Stunden bei 40° geschüttelt. Sofort nach Entnahme aus dem Thermostaten wurden die Lösungen gekocht, filtriert und das ph elektrometrisch mit Hilfe der Gaskette bestimmt. Nach etwa 12 Versuchsreihen gelang es ein ph-Optimum zwischen ph 7,6 und 7,7 für die Bildung der Vorstufe in der Leber nachzuweisen (Versuch 6 und Figur 3).

Figur 3.



ph-Optimum der Vorstufenbildung in der Leber

Wir sind also jetzt berechtigt, zu behaupten: Die Harnsäuresynthese erfolgt im Taubenorganismus in der Niere aus einem Stoff, Vorstufe genannt, der durch ein Ferment in der Leber optimal bei ph 7,6 und einer Temperatur von 40° gebildet wird.

Als neues Problem war die Frage nach der Quelle der Vorstufe von besonderem Interesse. Es muß nämlich letzten Endes zur Vorstufebildung eine Lieferung von Stickstoff einerseits und von Kohlenstoff andrerseits von irgendwoher erfolgen. Wie eingangs schon erwähnt, sollte sich nach H. Wiener das Harnsäuremolekül aus Harnstoff plus einer Dreikohlenstoffverbindung wie Milchsäure, Glycerin, Malonsäure oder Tartronsäure aufbauen. W. Schuler und W. Reindel (3) erwiesen eine derartige Vorstellung als unhaltbar. Auf Grund der Überlegung, daß die Harnsäuresynthese beim Vogel der Entfernung von Ammoniak dient, das bei der Desaminierung der Aminosäuren anfällt, gelangten sie zu dem Schluß, daß ein Zusatz von Aminosäuren zu Leber- und Nierenschnitten eine Mehrbildung an Harnsäure hervorrufen müßte, und konnten diese Annahme auch bestätigen.

Nachdem Zugabe von Aminosäure eine gesteigerte Harnsäuresynthese bedingt, wäre es denkbar, daß der Vorgang sich so vollzieht, daß die Aminosäuren durch das Leberferment in Vorstufe verwandelt werden und dann erst der lebenden Niere zur Harnsäurebildung Veranlassung gäben, jedoch ist dies noch keineswegs erwiesen. Wir schüttelten daher Alanin in einer Konzentration von 60 mg-% in Pufferlösung mit lebenden Leberschnitten, in einem anderen Versuche mit Lebertrockenpulver vier Stunden lang im Thermostaten bei 40°. Die weitere Verarbeitung der so erzielten Vorstufe mit Niere ließ uns zu einer erstaunlichen Vermehrung des Harnsäurewertes gelangen, die zum Teil 70—80% ausmachte. (Versuch 7a). Trockenleber verhielt sich in diesen ebenso günstig wie Frischleber. Ein Versuch, der die Wirkung von Alanin auf eine Leberlösung, die nach Schütteln gekocht war, mit einer solchen, die ungekocht unter Toluol aufbewahrt wurde, vergleichen ließ, legte die Vermutung nahe, daß mit Alanin eine weitere Vermehrung von Vorstufe der ungekochten Lösung vor sich ging; dies bedarf jedoch der Bestätigung und Ergänzung in weiteren Versuchen.

Zur völligen Klärung der Stickstoffquelle harrte weiterhin die Frage einer Lösung, ob die Aminogruppe aus den Aminosäuren sich in Form von Ammoniak abspaltet um so über den Weg der Vorstufe die Bildung des Harnsäuremoleküls zu veranlassen. Tatsächlich gelang es auch durch Zugabe von Ammoniumcarbonat, das besonders leicht Ammoniak abgibt, eine einwandfreie Mehrung von Harnsäure zu erreichen (Versuch 7 b). Ein Versuch mit Harnstoff als Stickstoffquelle mußte, wie schon nach dem früher Gesagten zu erwarten war, scheitern (Versuch 7 c). Damit scheint Stickstoff in dem Sinne in Reaktion zu treten, daß Ammoniak, das nach Desaminierung der in der Leber vorhandenen Aminosäuren auftritt,

durch ein Ferment zur Bildung einer Vorstufe führt, die ihrerseits in der lebenden Niere sich in Harnsäure verwandelt.

Inbezug auf den Sauerstoffverbrauch beim Lebervorgang ist auf Grund eines Versuches, bei dem die Bildung der Vorstufe einmal unter Stickstoff-, das andere Mal unter Sauerstoffatmosphäre stattfand, eine unbedingte Anwesenheit dieses Gases nicht erforderlich (Versuch 8). Die Tatsache, daß der Lebervorgang nicht an lebendes Gewebe gebunden ist, läßt sich mit diesem Resultat auch gut in Einklang bringen.

Zu erwähnen ist noch, daß sich auch Gänseleber in Pulverform zur Harnsäuresynthese vorzüglich eignet. Gerade letztere gelangte wegen ihrer Größe bei einzelnen ph-Versuchen in Anwendung.

Zusammenfassung.

Die Synthese der vom Vogel als Endprodukt des Eiweißstoffwechsels ausgeschiedenen Harnsäure erfolgt in der Niere aus einer in der Leber gebildeten Vorstufe, die noch unbekannt ist, aber kein Purin darstellt. Die Bildung der Vorstufe in der Leber erfolgt fermentativ bei einem ph-Optimum von 7,6—7,7 und bei einem Temperaturoptimum von 40°. Als Stickstoffquelle dient Ammoniak, das durch Desaminierung von Aminosäuren entsteht. Harnstoff kommt als Vorstufe für die Synthese nicht in Betracht.

Versuchsteil.

Herstellung der Gewebsschnitte:

Nach Tötung des Tieres werden die Organe (Leber und Niere) dem Körper entnommen und sofort in physiologische Kochsalzlösung von Körpertemperatur des Tieres gebracht. Nach Entfernung von Bindegewebe und Gefäßen werden mit dem Rasiermesser Schnitte von ca. 1 mm Dicke angefertigt, von denen mittels Torsionswage die nötige Menge abgewogen wird. Nach mehrmaligem Waschen in frischer, körperwarmer physiologischer Lösung werden die Schnitte in die Versuchslösung gebracht.

Herstellung des Organpulvers:

Das Organpulver wird nach der Methode von Willstätter dargestellt. Das von Bindegewebe befreite Organ wird rasch zerkleinert und in Aceton gebracht. Nach dreimaligem Schütteln mit der 4—5 fachen Menge an Aceton, einmalig mit Aceton-Aether 1 : 1 und dreimalig mit Aether wird der Organbrei abfiltriert und die auf dem Filter zurückbleibende Masse an der Luft getrocknet, zerrieben und durch ein Haarsieb passiert.

Herstellung von Vorstufenlösung:

Für die Darstellung der Vorstufe werden in einem Rundkölbchen 0,5 g Leberpulver, das ungefähr 2,5 g Frischleber entspricht, in 10 ccm sekundärem Phosphatpuffer von ph 8,3 aufgeschlemmt und mittels entsprechender Vorrichtung im Thermostaten bei 40° geschüttelt. Nach zwei Stunden, der Zeit, in der die Vorstufe maximal gebildet ist, wird der Kölbcheninhalt gekocht und filtriert. Für den Nierenversuch fügt man gewöhnlich zu 2 ccm der Vorstufenlösung 250 mg lebende Nierenschnitte und 8 ccm einer Phosphatpufferlösung von ph 7,1. Zur Ermittlung des Eigenharnsäuregehaltes der Niere stellt man in die Versuchsreihe noch ein Kölbchen mit 250 mg Niere in 10 ccm Puffer. Nach abermaligem Schütteln unter Sauerstoffzuleitung werden die Nierenschnitte nach vier Stunden abfiltriert und in der Lösung die Harnsäure bestimmt.

Harnsäurebestimmung:

2 ccm der Lösung werden nach O. Neubauer mit 0,5 ccm Uranylacetat und 7,5 ccm H_2O enteiweißt. Von dem Filtrat versetzt

man 2 ccm mit 0,9 ccm heiß gesättigter Sodalösung und fügt 0,1 ccm Phosphorwolframsäure hinzu. Die Intensität der jetzt auftretenden Blaufärbung läßt dann mit einer Vergleichslösung von zehnfachem Harnsäuregehalt die synthetische Harnsäure nach Folin colorimetrisch bestimmen. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration wird mittels der Gaskette elektrometrisch vorgenommen.

1. Verwendungsmöglichkeit von Acetonleber:

3 g Leber wurde in feinen Schnitten zu 15 ccm Phosphatpuffer ph 8,3 gegeben. Ebenso wurde dieselbe Menge Leber in Form von Trockenpulver in der Pufferlösung aufgeschlemmt. Beides wurde unter O_2-Zuleitung bei 40° vier Stunden lang geschüttelt. Nach Bildung der Vorstufe wurden 2 ccm der filtrierten Lösungen mit 250 mg Niere und 8 ccm Puffer ph 7,2 versetzt und wieder vier Stunden bei 40° geschüttelt.

	mg-% $\bar{U}$	synth. $\bar{U}$ in mg-%
Frischleber	5,95	4,55
Leberpulver	5,00	3,60
Niere allein	1,40	

2. Neubildung von Vorstufe in der Leber:

1. Frischleber:

2,8 g Frischleberschnitte wurden im 1. Falle aufgekocht, im 2. Falle nicht aufgekocht und beide vier Stunden in 15 ccm Phosphatpufferlösung ph 8,3 in O_2-Atmosphäre geschüttelt. Nach Aufkochen und Filtrieren wurden je 2 ccm der Extrakte plus 8 ccm Phosphatpuffer ph 7,2 mit 250 mg Nierenschnitten versetzt und vier Stunden in O_2 geschüttelt.

2. Leberpulver:

Zur Verwendung gelangten a) 0,75 und b) 0,54 g Leberpulver. Dieses wurde ebenfalls teils aufgekocht teils ungekocht in 15 ccm Puffer geschüttelt. Behandlung mit Niere wie oben.

	gebildete $\bar{U}$ in mg-%		synth. $\bar{U}$ in mg-%		Vermehrung in ungek. Leber	
1. Frischleber gekocht	1,60		0,50			
Frischleber ungekocht	2,50		1,40		0,90	
Nierenleerversuch	1,10					
	a	b	a	b	a	b
2. Leberpulver gekocht	3,15	1,65	1,10	0,65		
Leberpulver ungekocht	7,04	3,35	5,35	2,35	4,25	1,70
Nierenleerversuch	2,05	1,00				

3. Zeitlicher Verlauf des Vorganges in der Leber:

Je 0,5 g Leberpulver wurden bei 40 Grad in 15 ccm Phosphatpufferlösung ph 8,3 verschiedene Zeit lang ($^1/_2$—6 Stunden) geschüttelt. Der $\bar{U}$-Gehalt der Leber war praktisch Null. Nach Aufkochen, Filtrieren wurden 2 ccm davon in 8 ccm Phosphatpufferlösung ph 7,2 mit 250 mg Niere vier Stunden geschüttelt.

Versuch A	Nierenleerversuch = 1,2 mg-% $\bar{U}$				
Zeit in Stunden	1	2	4	5	6
Gebildete $\bar{U}$ in mg-% abzüglich Leerversuch	2,90	3,55	3,65	3,65	3,65

Versuch B	Nierenleerversuch = 1,65 mg-% $\bar{U}$					
Zeit in Stunden	$^1/_2$	1	$1^1/_2$	2	3	4
Gebildete $\bar{U}$ in mg-% abzüglich Leerversuch	1,55	2,25	2,55	2,55	2,65	2,65

4. Temperaturoptimum des Vorganges in der Leber:

Je 0,5 g Leberpulver wurden in 10 ccm Phosphatpufferlösung ph 8,3 drei Stunden lang bei verschiedener Temperatur geschüttelt. Nierenversuch wie unter 3.

Temperatur	20^0	30^0	40^0	65^0	90^0
Gebildete $\bar{U}$ in mg-% abzüglich 2,15 mg-% Leerversuch	2,45	3,55	5,25	1,40	0,95

5. Vergleich der Wirkung von Phosphat- und Glykokoll/Natronlaugepuffer von ph 8,3 bei der Bildung der Vorstufe:

Je 1 g Trockenpulver in 20 ccm Phosphat- bezw. Glykokoll/Natronlaugepuffer von ph 8,3 in Versuchsanordnung wie oben.

	gebildete $\bar{U}$ in mg-%	synth. $\bar{U}$ in mg-%
Phosphatpuffer	6,2	3,6
Glykokoll/Na OH	6,1	3,5
Leerversuch	2,6	

6. ph-Optimum des Vorganges in der Leber:

Das Leberpulver wurde auf der analytischen Wage gewogen und mit Glykokoll/NaOH-Puffer bei bestimmtem ph 2 Stunden lang geschüttelt. Anschließend wurde die Wasserstoffionenkonzentration zur Kontrolle bestimmt. Die gekochte und filtrierte Vorstufenlösung wurde dann durch Zugabe von n/10 HCl dem für den Nierenversuch optimalen ph 7,1 angeglichen. Weiter wie oben.

Versuchsbeispiel:

A. Gewinnung der Vorstufe:

Es liefen neben einem Nierenversuch 6 Versuche bei verschiedenem ph und zwar:

Lösung:	I	II	III	IV	V
mit je 1 g Leberpulver auf					
20 ccm Glykok./NaOH	19,4/0,6	18,7/1,3	16,8/3,2	14,0/6,8	11,8/8,2
bei einem ph von	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0

Nach 2 Stunden Aufkochen und Filtrieren.

B. Angleichung des ph an das Optimum der Niere:

Es wurden 2 ccm des Filtrats mit n/10 HCl titriert. Als Indikator diente Kresolrot. Filtrat III—V zeigten alkalische Reaktion. Es wurden dafür verbraucht:

Versuch	III	IV	V
n/10 HCl in ccm	0,10	0,35	0,55

C. Nierenversuch:

Von I und II wurden je 2 ccm mit 8 ccm des Phosphatpuffers ph 7,1 versetzt. Je 2 ccm von III, IV und V erhielten als Zusatz die bei der vorherigen Titration ermittelte Menge an n/10 HCl und wurden entsprechend auf 10 ccm mit dem Puffer aufgefüllt. Hierauf erfolgte Einsetzen der Kölbchen in den Thermostaten zu vierstündigem Schütteln.

D. Bestimmung der ph Werte sofort nach Vorstufenbildung mittels der Gaskette.

E. Ergebnis:

Lösung	I	II	III	IV	V
bei ph	6,8	7,2	8,0	8,8	9,2
synth. $\bar{U}$ in mg-%	2,65	3,40	6,50	5,30	4,90

Ergebnis weiterer ph Versuche:

Versuch I. Korr. = 2,10 mg-% $\bar{U}$					
ph	7,2	7,3	7,8	8,1	
Gebildete $\bar{U}$ in mg-%	5,3	5,7	4,2	3,15	
Versuch II. Korr. = 4,10 mg-% $\bar{U}$					
ph	6,7	7,3	7,8	8,3	8,6
Gebildete $\bar{U}$ in mg-%	12,9	13,9	15,9	15,5	14,3

Versuch III.	Korr. = 2,50 mg-% $\bar{U}$				
ph	6,8	7,2	**8,0**	8,8	9,2
Gebildete $\bar{U}$ in mg-%	2,65	3,4	**6,5**	5,3	4,9
Versuch IV.	Korr. = 1,4 mg-% $\bar{U}$				
ph	6,8	**7,8**	8,4	9,1	
Gebildete $\bar{U}$ in mg-%	4,5	**7,75**	6,65	6,2	
Versuch V.	Korr. = 2,05 mg-% $\bar{U}$				
ph	6,9	**7,5**	8,1	8,3	
Gebildete $\bar{U}$ in mg-%	7,3	**8,05**	5,9	5,1	
Versuch VI.	Korr. = 2,15 mg-% $\bar{U}$				
ph	6,9	7,4	**7,6**	8,0	
Gebildete $\bar{U}$ in mg-%	5,8	7,8	**8,3**	7,4	

7. Wirkung von Zusätzen auf die Bildung der Vorstufe in der Leber:

a) Zusatz von Alanin zu Frischleber: Je 430 mg Frischleber wurden einmal mit, das andere Mal ohne Alanin von 60 mg % Konzentration in 20 ccm Phosphatpuffer geschüttelt. Von der filtrierten Vorstufenlösung werden 10 ccm mit 250 mg Nierenschnitten unter O_2 vier Stunden bei 40 Grad geschüttelt. Zur Bestimmung der Eigenharnsäure der Niere wurde dieselbe Menge Niere in 10 ccm Krebslösung geschüttelt.

Lösung (nach Schütteln nicht gekocht)	gebildetes $\bar{U}$ in mg-%		synth. $\bar{U}$ in mg-%		Vermehrung durch Alanin	
	a	b	a	b	a	b
Frischleber	3,0	5,6	1,0	2,6		
Leber + Alanin	4,0	7,3	2,0	4,3	1,0	1,7
Niere allein	2,0	3,0				

Lösung (nach Schütteln gekocht)	gebildetes $\bar{U}$ in mg-%	synth. $\bar{U}$ in mg-%	Vermehrung durch Alanin
Frischleber	3,75	2,15	
Leber + Alanin	4,6	3,0	1,15
Niere allein	1,6		

Lösung	a) gekocht	b) ungekocht	Vermehrung durch Alanin	
	synth. $\bar{U}$			
Leber	1,35	1,85	a	b
Leber + Alanin	2,10	3,45	0,75	1,60
Niere allein	1,90			

b) Zugabe von Ammoniumcarbonat in einer Konzentration von 96 mg-%. Menge wie bei 7 a.

Lösung	Gebildete $\bar{U}$	synth. $\bar{U}$
Leber	4,7	2,9
Leber + $(NH_4)_2CO_3$	6,9	5,1
Niere allein	1,8	

c) Zugabe von Harnstoff in einer Konzentration von 30 mg-%. Menge wie 7 a.

Lösung	Gebildete $\bar{U}$	synth. $\bar{U}$
Leber	3,0	1,5
Leber + Harnstoff	3,0	1,5
Niere allein	1,5	

8. Einfluß von Sauerstoff auf die Bildung der Vorstufe in der Leber.

1 g Leberpulver wurde in 20 ccm Puffer unter O_2 bzw. N-Atmosphäre geschüttelt. Verarbeitung der gebildeten Vorstufe wie unter 2.

Lösung	Gebildete $\bar{U}$	synth. $\bar{U}$
Leber in O_2	8,4	6,5
Leber in N	8,4	6,5
Niere allein	1,9	

Zum Schlusse spreche ich Herrn Privatdozenten Dr. med. Werner Schuler für die Überlassung der Arbeit und die tatkräftige Unterstützung, die er mir durch seine wertvollen Ratschläge gab, meinen ergebensten Dank aus. Weiterhin ist es mir ein Bedürfnis, Herrn Dr. Wilhelm Reindel für seine bereitwillige Hilfe zu danken.

Literatur:

1. O. Minkowski, Arch. f. exper. Path. 21, 41 (1886); 31, 214 (1893).
2. H. Wiener, Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. und Path. 2, 42 (1902).
3. W. Schuler und W. Reindel. Klin. Wschr. 1933, Nr. 19, 736; 1933 Nr. 38, 1479; Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem. 221 (1933).
4. W. Nürmberger, Diss. Erlangen 1934.

Lebenslauf:

Am 3. März 1910 wurde ich, Renzo Ziebarth, zu Florenz (Italien) als Sohn des Kaufmanns Otto Ziebarth und seiner Ehefrau Anni geb. De Lorenzo geboren. Bis zu meinem 10. Lebensjahre besuchte ich die Volksschule zu Nürnberg. Im Herbst 1920 trat ich in das dortige Realgymnasium ein, wo ich nach neunjähriger Schulzeit das Reifezeugnis erhielt. Im Sommer 1929 widmete ich mich dem Medizinstudium zu Würzburg. Mein Physikum bestand ich 1931 in Königsberg i. Pr. Nach einem weiteren Semester in Innsbruck bezog ich die Universität Erlangen, an der ich im Dezember 1934 mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen beendet habe.